

可视化 LAMP 法快速检测转基因苜蓿草 J101 品系

刘二龙¹, 卢丽², 吕英姿¹, 蒋湘¹, 张旺², 林惠娇¹,
郑高彬¹, 唐婕^{3*}, 林学勤¹, 秦焯敏¹

(1. 黄埔出入境检验检疫局, 广州 510730; 2. 广东出入境检验检疫局, 广州 510623;
3. 陕西省动物研究所, 西安 710032)

摘要: **目的** 建立我国农业部未颁发农业转基因生物安全证书的转基因苜蓿草 J101 品系特异性环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)检测方法。**方法** 根据转基因苜蓿草品系 J101 3'端外源插入片段与苜蓿草基因组 DNA 之间的邻接区序列设计 6 条引物, 建立转基因苜蓿草 J101 品系特异性 LAMP 检测方法, 并对本方法的特异性、灵敏度进行了测定。**结果** 建立的检测方法特异性于转基因苜蓿草 J101 成分检测, 检测最低 DNA 浓度为(limit of detection, LOD)为 16 pg, 相当于 10 拷贝转基因苜蓿草 J101 基因组 DNA。**结论** 本研究建立的转基因苜蓿草 J101 品系特异性 LAMP 检测方法特异性好, 灵敏度高, 能够快速、准确、稳定地对转基因苜蓿草 J101 成分进行检测分析。

关键词: 环介导等温扩增; 转基因苜蓿 J101; 品系特异性

Visual loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of genetically modified alfalfa events J101

LIU Er-Long¹, LU Li², LV Ying-Zi¹, JIANG Xiang¹, ZHANG Wang², LIN Hui-Jiao¹,
ZHENG Gao-Bin¹, TANG Jie^{3*}, LIN Xue-qin¹, QIN Zhuo-Min¹

(1. Huangpu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangzhou 510730, China; 2. Guangdong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangzhou 510623, China; 3. Shaanxi Institute of Zoology, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT: Objective To establish a loop-mediated isothermal amplification(LAMP) detection method for genetically modified (GM) Roundup Ready alfalfa events J101, which has not been authorized by the Ministry of Agriculture of China. **Methods** The specific primer pairs based on the 3'junction sequence spanning the alfalfa DNA and inserted fragment of J101 were designed and then the LAMP detection system was established. The specificity and sensitivity were analyzed. **Results** The LAMP method was specific for GM alfalfa J101 detection, the limit of detection (LOD) were 16 pg J101 genomic DNA or 10 copies of alfalfa J101 haploid genomic DNA. **Conclusion** The established event-specific LAMP method for GM alfalfa J101 detection has high specificity and good sensitivity, and is suitable for quantification of J101 samples quickly and accurately. **KEY WORDS:** loop-mediated isothermal amplification; genetically modified alfalfa J101; event-specific

1 引言

我国牛奶的产量和品质较国外有较大的差距,

优质的饲草(以苜蓿草为代表)缺乏是原因之一。目前高质量的苜蓿草主要依赖进口, 据统计, 2014 年 1-6 月中国进口苜蓿草总计 40.56 万吨, 同比增 26.94%;

*通讯作者: 唐婕, 副研究员, 主要研究方向为微生物与分子生物学。E-mail: 22223520@qq.com

*Corresponding author: TANG Jie, Associate Researcher, Shaanxi Institute of Zoology, Xi'an 710032, China. E-mail: 22223520@qq.com

进口金额总计 14966.77 万美元^[1], 但由于国外苜蓿草有部分品种采用了转基因技术, 其生物安全性尚未获得我国农业部认可, 因此, 有效、准确和快速对进境转基因苜蓿草进行鉴定, 对于进境苜蓿草的监管非常重要。抗草甘膦转基因苜蓿草 J101(商品名 Roundup Ready Alfalfa Events J101)是由美国孟山都公司研制开发一种转基因苜蓿草品系, 2005 年美国 and 加拿大批准环境释放和作为饲料应用^[2], 我国尚未批准其进口, 目前国内外还没有转基因苜蓿 J101 品系特异性 LAMP 快速检测方法的报道。

环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 是由 Notomi 等^[3,4]于 2000 年开发, 其原理是针对目的核酸片段的设计一组特异性引物, 利用一种链置换 DNA 聚合酶在约 62 °C 进行等温扩增。扩增完成后, 加入特殊的染料, 可通过肉眼判定结果, 可以实现可视化的检测。

为了对转基因苜蓿草 J101 监管提供必要的技术支撑, 本文基于 J101 3'端外源插入片段与苜蓿草基因组 DNA 之间的邻接区序列列建立了转基因转基因苜蓿草 J101 品系特异性 LAMP 可视化检测方法。

2 材料与方法

2.1 材料、试剂与仪器

转基因苜蓿草 J101, 转基因玉米品系 MIR162, 转基因玉米品系 89034, 转基因玉米品系 NK63, 转基因玉米品系 BT11, 转基因大米 cry IA(a/b), 非转基因大叶苜蓿, 非转基因小麦, 非转基因油菜籽, 为本实验室储备, 转基因苜蓿草 J101 由重庆出入境检验检疫局惠赠。

主要试剂: Bst DNA polymerase large fragment、10×Thermopol buffer、MgCl₂ 均购自 New England Biolabs 公司; dNTPs 为天根生化科技公司产品; SYBR green I (10000×) 荧光染料为 Invitrogen 公司产品; 植物基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; 引物由英潍捷基公司合成。

主要仪器: CT15RE 高速冷冻离心机(HITACHI); ND2000C 微量分光光度计(Thermo Scientific); S1000PCR 仪(Bio-Rad); tanon 4200 凝胶成像系统(上海天能); 通用型电泳仪(Bio-Rad); 微量分光光度计(nanodrop2000c, 美国)、研磨机(IKA, 德国)。

2.2 方法

2.2.1 植物材料以及混合样品基因组 DNA 的提取与纯化

称取 100 mg 左右研磨成干粉的样品, 使用天根植物基因组 DNA 提取试剂盒并按照其操作说明书提取基因组 DNA。提取的基因组 DNA 用微量分光光度计 nanodrop2000c 测定浓度。提取的 DNA 溶液在 -20 °C 保存备用。

2.2.2 引物和探针设计

经查找美国专利中查找到转基因苜蓿草 J101 品系转基因片段部分序列^[5], 其外源插入片段元件组成见图 1。

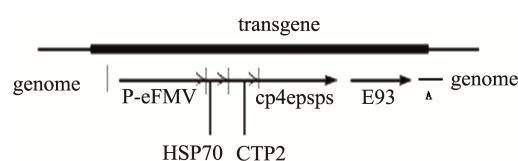


图 1 转基因苜蓿 J101 品系外源插入片段示意图

Fig. 1 The sketch map of inserted exogenous fragment in Roundup Ready alfalfa event J101

genome: 苜蓿草基因组 DNA; P-eFMV: 增强的玄参花叶病毒(FMV35s)启动子; HSP70: 热休克 70 kDa 蛋白; CTP2: 叶绿体转运肽基因 2; cp4epsps: 来源于农杆菌 CP4 的莽草酸羟基乙酰转移酶基因(5-烯醇丙酮莽草酸-3-磷酸酯合成酶基因); E93: 终止子; A 为引物设计位置

genome: alfalfa genome DNA; P-eFMV: enhanced version of the Figwort Mosaic Virus (FMV)35S Promoter; HSP70: Heat shock 70 kDa protein HSP70; CTP2: the chloroplast transit peptide 2 cp4epsps: 5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase obtained from Agrobacterium sp. strain CP4; E93: E9 3 terminator; A: the location of the primer pair

基于苜蓿基因组 DNA 的 3'端外源插入片段(靠近 E9 3 终止子)与苜蓿基因组 DNA 之间的邻接区序列分析, 使用 Primer Exploer V4 引物设计软件设计一套特异性的 LAMP 引物, 包括外引物 F3、B3 和内引物 FIP(F1c+F2)、BIP (B1c+B2)、以及环引物 Loop F、Loop B 共六条, 引物碱基序列见表 1。引物委托英潍捷基公司合成。

2.2.3 LAMP 反应体系

LAMP 检测反应体系为 25 μL: 10×Thermopol buffer 2.5 μL、F3 和 B3 各 0.5 μL(10 μmol/L)、FIP 和 BIP 各 1 μL(40 μmol/L)、LF 和 LB 各 0.5 μL(40 μmol/L)、dNTPs 4 μL (10 mmol/L)、MgSO₄ 1 μL(100 mmol/L)、Bst DNA polymerase 1 μL(8 U/μL)、Template DNA 1 μL 和 11.5 μL ddH₂O。

表 1 J101 品系特异性 LAMP 引物
Table 1 LAMP primer sets for specific amplification of J101

引物	引物序列(5'→3')
FIP(F1c+F2)	ATCGATGCGGCCACCACTGACTTGCCAATTGATTGACAAC
BIP(B1c+B2)	CCCATTGGACGTGAATGTAGATTAATGCATACGATCCGTCG
F3	TTCCAGAATCCTTGTCAGATTC
B3	GCTGGAATTAGCAAGATAAG
LoopF	GGCTGCAGGTCGATTGAT
LoopB	CACGTCGAAATAAAGATTTCG



图 2 六条引物在 3'邻接区序列对应的位置

Fig. 2 Locations of the six primers in 3'flanking sequence (the host genomic DNA sequence was underlined)

反应程序为: 63 °C恒温反应 60 min, 85 °C加热 2 min 使酶失活, 反应即结束;

检测结果的判定, 采用以下两种方法之一进行结果判定:

1)颜色变化: 向反应终体系加入 0.2 μL SYBR green I, 1 min 观察结果, 阳性反应呈现黄绿色, 而阴性的反应保持橙色;

2)电泳检测: LAMP 法扩增的产物是各种不同长度的茎-环状结构 DNA, 因此阳性反应的产物经过 1.5%琼脂糖电泳检测呈梯形条带, 而阴性反应则没有梯形扩增条带出现。

2.2.4 LAMP 检测方法的特异性

利用 8 种常见植物材料转基因苜蓿草 J101 品系、转基因玉米品系 MIR162、转基因玉米品系 89034、转基因玉米品系 BT11、转基因大米 cry IA(a/b)、非转基因油菜籽、非转基因小麦、非转基因大叶苜蓿的基因组 DNA 为模板, 采用已建立的转基因苜蓿 J101 品系特异性 LAMP 方法进行扩增, 检测本文建立的方法的特异性。

2.2.5 LAMP 方法的灵敏度

将提取的转基因苜蓿草 J101 基因组 DNA 溶液用 TE 缓冲液梯度稀释至 16 ng、1.6 ng、0.16 ng、0.08 ng、0.016 ng、0.008 ng 和 0.0016 ng 测定建立的检测方法的检测下限(limit of detection, LOD)。

2.2.6 LAMP 方法与荧光定量 PCR 方法的比较

收集进境的转基因大豆, 转基因玉米, 转基因苜蓿草等 20 份样品, 提取 DNA 按本文 2.2.3 进行检测。采用转基因苜蓿草 J101 品系特异性荧光 PCR 方法(该方法另文阐述)验证检测结果。

3 结果与分析

3.1 引物和探针设计

本研究根据转基因苜蓿草 J101 品系的 3'外源插入片段和苜蓿草基因组 DNA 邻接区序列进行分析, 设计了多套品系特异性引物, 对引物扩增效果进行筛选和分析, 并对 LAMP 的各组分浓度进行优化, 最终建立转基因苜蓿草 J101 品系特异性 LAMP 检测方法(引物见表 1)。

3.2 特异性测试

为了测试建立的转基因苜蓿草 J101 品系特异性检测方法的特异性, 以 8 种常见作物

基因组 DNA 为模板进行 LAMP 扩增。

采用转基因苜蓿草 J101 品系特异性 LAMP 引物进行 LAMP 扩增后, 扩增产物加入 0.2 μ LSYBR green I 后的仅转基因苜蓿 J101 品系 DNA 为模板的扩增产物显黄绿色(图 3 A), 对扩增产物进行 1.5 % 琼脂糖凝胶电泳检测, 仅 J101 模板的反应有梯状带出现(图 3 B)。表明本研究建立的 LAMP 检测方法特异于转基因苜蓿草 J101 品系的检测。

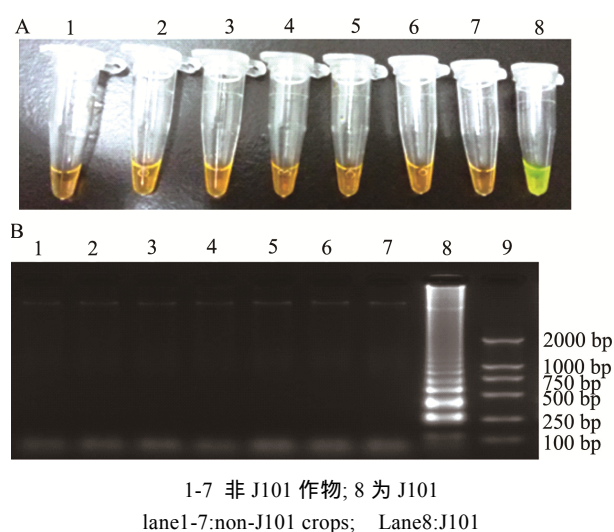


图 3 建立的 LAMP 检测方法的特异性测试
Fig. 3 Specificity test of the established LAMP assay

3.3 灵敏度测试

在本文中, 提取的转基因苜蓿草 J101 基因组 DNA 浓度为 200 ng/ μ L, DNA 溶液用 TE 缓冲液梯度稀释至 16 ng/ μ L、1.6 ng/ μ L、0.16 ng/ μ L、0.08 ng/ μ L、0.016 ng/ μ L、0.008 ng/ μ L 和 0.0016 ng/ μ L 的 J163 基因组 DNA 模板进行检测, 以大于等于 0.016 ng/ μ L (16 pg/ μ L) 基因组 DNA 为模板时, 扩增后产物经电泳有特征性梯状带, 加入 SYBR green I 会有黄绿色产生。而以 0.008 ng/ μ L 和 0.0016 ng/ μ L 的 J101 基因组 DNA 模板时, 则无上述反应结果(图 4 A 和图 4 B)。表明该 LAMP 体系可以检测 J101 基因组 DNA 的最低检测限为 0.016 ng (16 pg/ μ L), 由于苜蓿草的基因组 DNA 的估算为 1510 Mbp, 相应的, 重量大约估算为 1.6 pg^[6], 即可检测到 10 个拷贝的 J101 基因组 DNA。

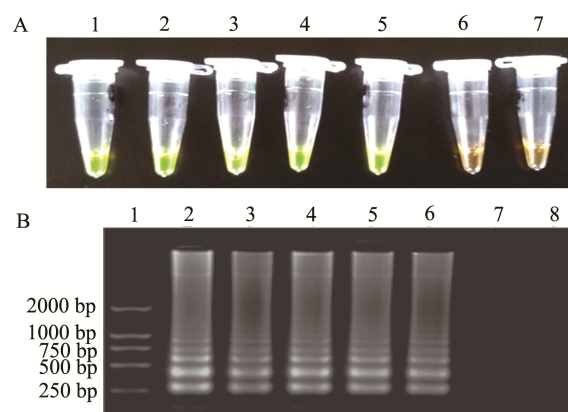


图 4 转基因苜蓿草 J101 品系 LAMP 方法灵敏度测试
Fig. 4 Sensitive tests for the established LAMP method for GM alfalfa J163

2-8 转基因苜蓿草 J101 基因组 DNA 分别为 16 ng、1.6 ng、0.16 ng、0.08 ng、0.016 ng、0.008 ng、0.0016 ng

The quantities of the J101 genome in each dilution from left to right were 16 ng, 1.6 ng, 0.16 ng, 0.08 ng, 0.016 ng, 0.008 ng and 0.0016 ng per reaction, respectively.

3.4 LAMP 方法与荧光定量 PCR 方法的比较

本文建立的 LAMP 检测方法, 对于本室采集的转基因大豆, 转基因玉米, 转基因苜蓿草等 20 份样品检测的结果显示, 检出转基因苜蓿 J101 产品一份, 其他为阴性结果, 与本实验室建立的转基因苜蓿草 J101 实时荧光 PCR 方法(另文发表)的结果相同(图略)。

4 讨论

缩短我国牛奶品质与产量与国外的差距, 重要的前提在于提供优质的苜蓿草等饲料。但目前国内的尤其是以紫花苜蓿为代表的优质牧草产业, 急需培育和升级。目前大量优质的苜蓿草主要依赖进口。国外培育和种植的优质苜蓿草品种, 有一部分为尚未经我国农业部批准进口的转基因产品(如孟山都公司的抗除草剂品种)。转基因苜蓿草通过饲料进入动物养殖的食物链, 可能对于人的健康产生影响。根据《农业转基因生物安全管理条例》等法规, 同时也为保障消费者的知情权, 转基因产品必须实施产品标识。目前转基因产品标识制度在 30 多个国家和地区应用^[6]。中国目前实施无阈值的强制性标识制度^[7]。

品系特异性检测方法是基于外源插入片段和宿主基因接合区的边界序列建立特异性的检测方法, 可以对转基因产品品系进行判定, 被认为是最适合

转基因标识的检测判定方法^[8-10]。国内外已建立了多种转基因作物的检测方法^[11-15]。目前,国内转基因苜蓿草检测策略大多采用检测启动子、终止子或 EPSPS 基因等筛查检测从而确定是否转基因苜蓿草,但对于不同品系的转基因苜蓿草不能进行鉴别性检测,无法满足转基因产品身份验证等需求。

本文通过转基因苜蓿草 J101 品系的 3'端外源插入片段(靠近 E9 3 终止子)与苜蓿草基因组 DNA 之间的邻接区序列,结合序列信息的分析,设计和筛选的一组共 6 条 LAMP 引物对靶序列的 8 个特异序列区的识别,实现了 J101 品系特异性的检测,加入荧光显色剂使 LAMP 检测结果的可视化得以实现。采用该方法对采集的样品进行实测,检测结果和本实验室建立的实时荧光 PCR 检测结果完全一致。可满足监管部门对转基因苜蓿草 J101 进行产品身份验证等检测、监测和安全管理的需求。

参考文献

- [1] [EB/OL]. http://www.sdcy.gov.cn/art/2014/8/7/art_5561_83138.html
- [2] Alexander TW, Reuter T, McAllister TA. Qualitative and quantitative polymerase chain reaction assays for an alfalfa (*Medicago sativa*)-specific reference gene to use in monitoring transgenic cultivars [J]. *Agric Food Chem*, 2007, 8(55): 2918-2922.
- [3] Mori Y, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A rapid accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases[J]. *J Infect Chemother*, 2009, 15(2): 62-69.
- [4] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(12): E63.
- [5] Beazley KA, Ferreira KL, Filtzhamck SN, *et al.* Glyphosate tolerant alfalfa events and methods for detection[P]. United States patent, US 7,566,817 B2, Jul. 28, 2009.
- [6] Arumuganthan K, Earle ED. Nuclear DNA content of some important plant species[J]. *Plant Mol Biol Rep*, 1991, 9: 208-218.
- 中华人民共和国农业部, 2002. 农业部第 10 号令《农业转基因生物标识管理办法》
Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. 2002. Order 10 Administration of Agricultural Genetically Modified Organisms Labeling.
- [7] Wu G, Wu YH, Xiao L, *et al.* Event-specific qualitative and quantitative PCR detection of genetically modified rapeseed Topas 19/2 [J]. *Food Chem*, 2008, (1): 232-238.
- [8] Zimmermann A, Lüthy J, Pauli U. Event specific transgene detection in Bt11 corn by quantitative PCR at the integration site [J]. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 2000, 33: 210-216.
- [9] 蒋利平, 翁绿水, 肖国樱. 转基因水稻 B2A68 事件特异性检测方法的建立[J]. *杂交水稻*, 2013, 05: 60-67.
- Jiang LP, Weng LS, Xiao GY. Establishment of an event-specific method to detect transgenic rice B2A68 [J]. *Hybrid Rice*, 2013, 28(5): 60-67.
- [10] Babekova R, Funk T, Pecoraro S, *et al.* Development of an event-specific Real-time PCR detection method for the transgenic Bt rice line KMD1 [J]. *Eur Food Res Technol*, 2009, (5): 707-716.
- [11] Li X, Pan LW, Li JY, *et al.* Establishment and Application of Event-Specific Polymerase Chain Reaction Methods for Two Genetically Modified Soybean Events, A2704-12 and A5547-127 [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, (24): 13188-13194.
- [12] Liu Y, Zhang MH. Event-specific qualitative and quantitative detection in transgenic soybean OsDREB3 based on the 5' Flanking Sequence [J]. *Food Biotechnol*, 2014, (1): 63-67.
- [13] Jiang LX, Yang LT. Development and in-house validation of the event-specific qualitative and quantitative PCR detection methods for genetically modified cotton MON15985 [J]. *J Sci Food Agric*, 2010, (3): 402-408.
- [14] Wu G, Wu Y, Xiao L, *et al.* Event-specific qualitative and quantitative PCR methods for the detection of genetically modified rapeseed Oxy-235 [J]. *Transgenic Res*, 2008, (5): 851-862.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



刘二龙, 工程师, 主要研究方向为微生物与分子生物学。
E-mail: erlongliu@126.com

唐 婕, 副研究员, 主要研究方向为微生物与分子生物学。
E-mail: 22223520@qq.com